

W5016-02

ADSORBENT OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE, HUMAN BLOOD CELL DIFFERENTIATION CELL AND HUMAN CELL

Publication number: JP2000217575 (A)

Publication date: 2000-08-08

Inventor(s): FUNAYAMA SEIZO; SEKO KAZUHIRO; FUNAYAMA MASASHI +

Applicant(s): FUNAYAMA MASASHI +

Classification:

- **International:** *B01J20/281; C12N11/04; G01N30/88; G01N33/53; G01N33/547; B01J20/281; C12N11/00; G01N30/00; G01N33/53; G01N33/544; (IPC1-7): C12N11/04; G01N30/48; G01N30/88; G01N33/53; G01N33/547*

- **European:**

Application number: JP19990062121 19990201

Priority number(s): JP19990062121 19990201

Abstract of JP 2000217575 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject adsorbent capable of adsorbing a human blood cell differentiation cell and human cell in a short time with saved energy by bonding a specific spacer arm to a carrier packed into a column, etc., activating the carrier and circulating a ligand solution through the column. **SOLUTION:** A spacer arm having 300-5,000,000 number-average molecular weight is bonded to a carrier prepaced into a column or a modularized carrier. Then the carrier is activated and a ligand solution such as a protein A, lectin, an antibody to a human blood cell differentiation cell, an antibody to human cell, etc., is circulated through the column (or module) and the ligand is immobilized to the carrier to give the objective adsorbent of physiologically active substance, human blood cell and human cell capable of adsorbing a physiologically active substance, a human blood cell differentiation cell and a human cell in a short time with a saved energy in a reduced space in high adsorption performances.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-217575

(P2000-217575A)

(43) 公開日 平成12年8月8日 (2000.8.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 11/04		C 1 2 N 11/04	4 B 0 3 3
G 0 1 N 30/48		G 0 1 N 30/48	R
30/88		30/88	J
33/53		33/53	K
33/547		33/547	
審査請求 未請求 請求項の数5 書面 (全 6 頁)			

(21) 出願番号	特願平11-62121	(71) 出願人	591053328 船山 政志 埼玉県大宮市指扇領別所214- 1
(22) 出願日	平成11年2月1日 (1999.2.1)	(72) 発明者	船山 政蔵 山形県長井市今泉1145番地
		(72) 発明者	世古 和弘 奈良県奈良市あやめ池北一丁目5-12-2
		(72) 発明者	船山 政志 埼玉県大宮市指扇領別所214- 1
		F ターム(参考)	4B033 NA01 NA42 NA43 NA45 NB04 NB15 NB45 NB49 NB57 NC03 NC12 ND03 ND20 NF02

(54) 【発明の名称】 生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体。

(57) 【要約】

【課題】 短時間、省エネルギー、省スペース、高吸着性能の生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体を提供する。

【解決手段】 予めカラムに充填した担体、またはモジュール化した担体に、数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、次に当該担体を活性化した後、更に、当該カラム（またはモジュール）にリガンド溶液を循環させることにより、当該担体にリガンドを固定化したことを特徴とする、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体を使用する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 予めカラムに充填した担体、またはモジュール化した担体に、数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、次に当該担体を活性化した後、更に、当該カラム（またはモジュール）にリガンド溶液を循環させることにより、当該担体にリガンドを固定化したことを特徴とする、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体。

【請求項2】 予めカラムに充填した担体、またはモジュール化した担体に、数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、次に当該担体を活性化した後、更に、当該カラム（またはモジュール）にリガンド溶液を循環させることにより、当該担体にリガンドを固定化したことを特徴とする、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体の製造方法。

【請求項3】 数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、カラムに充填した担体、またはモジュール化した担体を活性化した後、更に、当該カラム（またはモジュール）にリガンド溶液を循環させることにより、当該担体にリガンドを固定化したことを特徴とする、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体。

【請求項4】 数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、カラムに充填した担体、またはモジュール化した担体を活性化した後、更に、当該カラム（またはモジュール）にリガンド溶液を循環させることにより、当該担体にリガンドを固定化したことを特徴とする、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体の製造方法。

【請求項5】 リガンドを、プロテインA、シバクロンブルー、デキストラン硫酸、ヒアルロン酸、カルボキシメチルキチン、ヘパリノイド（ヘパリン、セルロース硫酸、キチン硫酸、キトサン硫酸、ペクチン硫酸、コンドロイチンポリ硫酸、イヌリン硫酸、アルギン硫酸、グリコーゲン硫酸、カラゲニン硫酸、デンプン硫酸、ポリビニルアルコール硫酸、ポリグルコース硫酸、ポリラクトース硫酸、ラミナリン硫酸、ガラクトタン硫酸、レバン硫酸、天然多糖体エステル硫酸等）、レクチン（ダツラレクチン、ヒドロチャワンタケレクチン、レンチルレクチン、イヌエンジレクチン、インゲンマメレクチン、ピーナツレクチン、ヒママメレクチン、ニホンニワトコレクチン、小麦胚芽レクチン、ヒママメレクチン、ロータスレクチン、アメリカヤマゴボウレクチン等）、ヘキサノールアミン、キトオリゴ糖、コンカナバリンA、フコースバインディングプロテイン、フコース、セロトニン、ラクトース、マルトース、プロテインG、アルギニン、ベンズアミジン、カルモジュリン、リジン、プロシオンレッド、5' AMP、2', 5' AMP、-NH₂

（アミノ基）、-COOH（カルボキシ基）、-SO

3'-（硫酸基）、イミノ酢酸、天然コウシDNA、変性コウシDNA、7-メチルGTP誘導体、ポリウリジル酸、ポリリボイノシン酸、ポリリボシチジル酸、オリゴ（dT）、オリゴ（dA）、ヒト血球分化細胞に対する抗体、ヒト細胞に対する抗体、IgM、IgG、ハプトグロビン、フェニルホウ酸およびその誘導体からなる群から選択することを特徴とする、請求項1および請求項3に記載の生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体に関し、更に詳しくは、数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを介して、不溶性担体にリガンドを固定化したことを特徴とする、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体に関する。

【0002】

【従来の技術】不溶性担体に生理活性物質に対するリガンドまたは、ヒト血液細胞に対する抗体を固定化したアフィニティークロマトグラフィー担体が、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体として広範に利用されている。

【0003】現在、日本で市販されているアフィニティークロマトグラフィー担体（ゲル）には、アフィゲル102（BIO-RAD社製）、アフィゲル601（BIO-RAD社製）、IMMOBILIZED DIAMINODIPROPYLAMINE GEL（PIERCE CHEMICAL COMPANY社製）、IMMUNOPURE EPOXY-ACTIVATED AGAROSE（PIERCE CHEMICAL COMPANY社製）、IMMOBILIZED TNB THIOL（PIERCE CHEMICAL COMPANY社製）、POLYSTYRENE HYDRIDE BEADS（PIERCE CHEMICAL COMPANY社製）、TRESYL ACTIVATED AGAROSE（PIERCE CHEMICAL COMPANY社製）、REACT GEL（PIERCE CHEMICAL COMPANY社製）、ULTRALINK BIOSUPPORT MEDIUM（PIERCE CHEMICAL COMPANY社製）、オイパーギットC（EPCELASTIN PRODUCTS COMPANY INC社製）、TSK GEL AFCタイプ（東ソー社製）、セファロース（ファルマシア社製）、セルロファイン（チッソ社製）等があるが、何れもスペーサーアームの分子量が、300以下である為、固定化するリガンド量が多い場合には、立体障害の関係から、吸着する生理活性物質や、ヒト血球分化細胞等の量が減少するという問題があった。

10

20

30

40

50

【0004】近年、膜を用いて分離、吸着を行なうことも盛んになってきた。膜で分離を行なうことによる最大の利点は、省エネルギーにある。それ故に、逆浸透膜（RO）、限外ろ過膜（UF）、精密ろ過膜（MF）等のろ過分離膜は、半導体工業、医薬品工業、食品工業等の分野で幅広く使用されている。一方、多孔質膜を上記の様なる過膜としてではなく、吸着体として利用しようとするのがBrandtらによって提案されている（S. Brandt et al., Bio/Technology, 6, 779-782, 1988）。

【0005】Brandtらは、蛋白質をクロマトグラフィーの様に吸着回収する為の理想的な吸着体は、厚みが薄く、面積が大きな多孔性構造体すなわち多孔性膜であると記述している。Brandtらの提案する理想的な吸着体とは、短時間、省エネルギー、省スペースで、高回収率で蛋白質を行なうということであり、現在セファロースゲル等のゲルを用いてアフィニティー吸着、分離が実施されている分野に多孔性構造体を応用することで効率化（省エネルギー）を図ろうとする提案と解釈できる。Brandtらは、蛋白吸着のリガンドとしてプロテインAを固定化した多孔性膜を作製している（上記文献）。

【0006】また、藤里らもセルロースダイアライザーに抗体を固定化することを提案している（The Third Far-Eastern Symposium on Biomedical Materials）。更にまた、斎藤らも蛋白質回収を目的とした、リガンドを放射線グラフト重合した多孔性中空糸膜を提案している（J. Chromatogr. A, 585, 45 (1991)）。当該方法は、リガンドの固定密度を高くできる、リガンドが脱離しにくい、大量作製が可能である等の利点がある。

【0007】これらの提案に使用される担体は、何れも多孔性膜および多孔性中空繊維であり、また、本発明の発明者らも無孔性膜および無孔性中空繊維にリガンドを結合した担体を提案している。然し乍ら、これらの提案のなかでは、担体とリガンドとの結合は、担体の水酸基（-OH）とリガンドとが直接結合するか、または分子量が300以下の、短いスペーサーアームを介して結合している。それ故に、リガンドの固定密度を高くした場合には、ゲルの場合と同様に、立体障害の問題が生じる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の第一の目的は前記問題点の解決にある。即ち、現在、リガンドと担体との結合が、担体の水酸基（-OH）とリガンドとが直接結合するか、または分子量が300以下のスペーサーアームを介することにより結合しているものを、数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを介して、不溶性担体にリガンドを固定化することに

より、立体障害の問題がない、高吸着性能の生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体および吸着分離方法を提供することにある。

【0009】本発明の第二の目的は、予めカラムに充填した担体、またはモジュール化した担体に、数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、更に、本発明に関するリガンド溶液を循環させることにより、リガンドを一定方向に向けて固定化することにより、従来品（担体にスペーサーアームおよびリガンドを固定化した後、当該担体をカラムまたはモジュールに充填する。）よりも吸着活性の高い生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成する為、本発明の発明者は鋭意研究を重ねた結果、予めカラムに充填した担体、またはモジュール化した担体に、数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、更に、当該不溶性担体にリガンドを固定化することにより、立体障害の問題がない、従来品よりも高吸着性能の生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体および吸着分離方法を提供することが可能であることを発見し、本発明を完成した。

【0011】即ち、本発明は以下の様な構成を有するものである。

（1）予めカラムに充填した担体、またはモジュール化した担体に、数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、次に当該担体を活性化した後、更に、当該カラム（またはモジュール）にリガンド溶液を循環させることにより、当該担体にリガンドを固定化したことを特徴とする、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体。

（2）予めカラムに充填した担体、またはモジュール化した担体に、数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、次に当該担体を活性化した後、更に、当該カラム（またはモジュール）にリガンド溶液を循環させることにより、当該担体にリガンドを固定化したことを特徴とする、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体の製造方法。

（3）数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、カラムに充填した担体、またはモジュール化した担体を活性化した後、更に、当該カラム（またはモジュール）にリガンド溶液を循環させることにより、当該担体にリガンドを固定化したことを特徴とする、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体。

（4）数平均分子量が300～5,000,000のスペーサーアームを結合させ、カラムに充填した担体、またはモジュール化した担体を活性化した後、更に、当該カラム（またはモジュール）にリガンド溶液を循環させ

ることにより、当該担体にリガンドを固定化したことを特徴とする、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体の製造方法。

(5) リガンドを、プロテインA、シバクロンブルー、デキストラン硫酸、ヒアルロン酸、カルボキシメチルキチン、ヘパリノイド(ヘパリン、セルロース硫酸、キチン硫酸、キトサン硫酸、ペクチン硫酸、コンドロイチンポリ硫酸、イヌリン硫酸、アルギン硫酸、グリコーゲン硫酸、カラゲニン硫酸、デンブリン硫酸、ポリビニルアルコール硫酸、ポリグルコース硫酸、ポリラクトース硫酸、ラミナリン硫酸、ガラクトタン硫酸、レバン硫酸、天然多糖体エステル硫酸等)、レクチン(ダツラレクチン、ヒドロチャワンタケレクチン、レンチルレクチン、イヌエンジレクチン、インゲンマメレクチン、ピーナツツレクチン、ヒママメレクチン、ニホンニワトコレクチン、小麦胚芽レクチン、ヒママメレクチン、ロータスレクチン、アメリカヤマゴボウレクチン等)、ヘキサノールアミン、キトオリゴ糖、コンカナバリンA、フコースバインディングプロテイン、フコース、セロトニン、ラクトース、マルトース、プロテインG、アルギニン、ベンズアミジン、カルモジュリン、リジン、プロシオンレッド、5' AMP、2', 5' AMP、 $-NH_2$ (アミノ基)、 $-COOH$ (カルボキシル基)、 $-SO_3^-$ (硫酸基)、イミノジ酢酸、天然コウシDNA、変性コウシDNA、7-メチルGTP誘導体、ポリウリジル酸、ポリリボイノシン酸、ポリリボシチジル酸、オリゴ(dT)、オリゴ(dA)、ヒト血球分化細胞に対する抗体、ヒト細胞に対する抗体、IgM、IgG、ハプトグロビン、フェニルホウ酸およびその誘導体からなる群から選択することの特徴とする、(1)および(3)に記載の生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明の生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体に使用される担体の素材は、多糖体型樹脂(アガロース、架橋アガロース、セルロース、架橋セルロース、成型化セルロース誘導体、デキストランゲル等)、プラスチック(ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、メタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、ポリイソプロピルアクリルアミド、ポリエステル、ポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン等)、銅アンモニア法再生セルロース、酢酸セルロース法再生セルロース、ポリメタクリル酸メチルのステレオコンプレックス、ポリアクリルニトリル系、エチレンービニルアルコール系共重合体、キトサンービニルアルコール系共重合体、合成ポリアミノ酸、再生コラーゲン、ポリエーテルカーボネート、キチン、キトサン、ポリマーアロイ、ポリメチルメタクリレート、ガラス、セラミック、繊維、紙、合成紙、中空

糸、無孔性構造体、無孔性中空糸、金属の何れかであることが好ましいが、必ずしもこれらに限定される訳ではない。当該膜素材のうち、血液適合性を欠如する素材については、場合によっては血液適合性を付与して使用することが好ましい。

【0013】また、担体が膜の場合、膜形態は非対称膜または複合膜であることが好ましい。更に、モジュールの形式は、スパイラル、中空糸または管状であることが好ましい。また、孔構造は、均質構造、グラジエント構造、または対称グラジエント構造であることが好ましいが、必ずしもこれらに限定される訳ではない。医療用途以外に用いる無孔性構造体を充填するモジュールは、透析液の出入口を必要としない。

【0014】本発明に係わる、生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体に使用される担体とリガンドとの固定化は、リガンドが剥離することのない共有結合法が好ましい。共有結合法であれば、臭化シアン法、オキシラン法、ジビニルスルホン法、グルタルアルデヒド法、酸無水物法、N-ヒドロキシサクシイミド法、ジアゾカップリング法、同反応性二価試薬を用いる方法、異反応性二価試薬を用いる方法、光化学反応法等のうち何れの方法を用いても良い。担体が反応性官能基を有する場合には、共有結合法を用い、反応性官能基を有しない場合には、光化学反応法、グラフト重合法等を用いることが好ましい。また、担体とリガンドとの固定化は、ポリエチレングリコール、アルキルジアミン、ポリエチレンイミン等のスペーサーアームを介して行なうことが必須で、スペーサーアームは親水性スペーサーアームであることが好ましい。

【0015】数平均分子量が300~5,000,000の親水性スペーサーアームとしては、ポリエチレングリコールおよびその誘導体、ポリプロピレングリコールおよびその誘導体、ポリアクリルアミドおよびその誘導体、ポリエチレンイミンおよびその誘導体、ポリエチレンオキシドおよびその誘導体、ポリエチレンテレフタル酸およびその誘導体、ポリエチレンビニル酢酸およびその誘導体、ポリ3ヒドロキシ酢酸およびその誘導体、ポリ-L-アミノ酸およびその誘導体、ポリビニルピロリドンおよびその誘導体、ポリシロキサンおよびその誘導体の他、これ等の物質の架橋物も包含する。数平均分子量が300~5,000,000の親水性の化合物でさえあれば、何等これらに限定されない。

【0016】各々のリガンドが捕捉する物質は以下の通りである。すなわち、プロテインA(捕捉物質:各種細胞)、シバクロンブルー(捕捉物質:脱水素酵素群、キナーゼ群等)、デキストラン硫酸、ヒアルロン酸、カルボキシメチルキチン、ヘパリノイド(セルロース硫酸、キチン硫酸、キトサン硫酸、ペクチン硫酸、コンドロイチンポリ硫酸、イヌリン硫酸、アルギン硫酸、グリコーゲン硫酸、カラゲニン硫酸、デンブリン硫酸、ポリビニル

アルコール硫酸、ポリグルコース硫酸、ポリラクトース硫酸、ラミナリン硫酸、ガラクトタン硫酸、レバン硫酸、天然多糖体エステル硫酸)、(以上の捕捉物質: アンチトロンビンIII、血液凝固因子等)、レクチン(ダツラレクチン、ヒドロチャワンタケレクチン、レンチルレクチン、イヌエンジレクチン、インゲンマメレクチン、ピーナツレクチン、ヒマメレクチン、ニホンニワトコレクチン、小麦胚芽レクチン、ヒマメレクチン、ロータスレクチン、アメリカヤマゴボウレクチン等)、

(以上の捕捉物質: 各種細胞等)、ヘキサノールアミン、キトオリゴ糖、コンカナバリンA(以上の捕捉物質: 糖蛋白質等)、フコースバインディングプロテイン(捕捉物質: フコース)、フコース、セロトニン、ラクトース、マルトース、プロテインG、アルギニン、ベンズアミジン、カルモジュリン、リジン、プロシオンレッド、5' AMP、2', 5' AMP、イミノジ酢酸、天然コウシDNA、変性コウシDNA(以上の捕捉物質: DNAポリメラーゼ等)、7-メチルGTP誘導体(捕捉物質: Eukaryotic mRNA、Cap結合蛋白等)、ポリウリジル酸、ポリリボイノシン酸(捕捉物質: mRNA等)、ポリリボシチジル酸(捕捉物質: RNA含有poly(A))、オリゴ(dT)、オリゴ(dA)、(以上の捕捉物質: poly(U))、ヒト血球分化細胞に対する抗体(捕捉物質: ヒト血球分化細胞)、ヒト細胞に対する抗体(捕捉物質: ヒト細胞)、ハプトグロビン(捕捉物質: 遊離ヘモグロビン)、フェニルホウ酸およびその誘導体(捕捉物質: グリコヘモグロビン、グリコプロテイン等)。尚、-NH₂、-COOH、-SO₃Hについては、各種リガンドの結合に用いる。

【0017】リガンドを固定化する担体は、予め、カラム(担体がゲルの場合)またはモジュール(担体が中空糸等の繊維の場合)に充填する。次に、当該担体を活性化し、当該担体に数平均分子量が300~5,000,000のスペーサーアームを固定化する。最後に当該不溶性担体に本発明に関するリガンドを固定化する。当該方法により調製した本発明に関する生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体は、従来品と比較して、吸着活性が格段に向上する。本発明には、更に、

【0018】

【実施例】本発明を実施例により更に詳細に説明する。本発明は実施例により、何ら限定されるものではない。

【0019】《実施例1.》

——長鎖スペーサーアームを介したハプトグロビン固定

化中空糸膜の調製——

キトサン製中空糸を充填したモジュール(内径200マイクロメートル、膜厚20マイクロメートル、有効長195mm、ポア半径80オングストローム、有効膜面積1.6m²、血液容量94ml)を筏等の方法(岸田晶夫、筏義人:人工臓器、17:47~50、1988)に準じて、中空糸膜内部の表面に数平均分子量が10,000のポリエチレングリコールビスアミンをスペーサーアームとし、ハプトグロビンを固定化したモジュールを調製した。当該中空糸膜へのハプトグロビンの固定化量は50マイクログラム/cm²であった。また、当該中空糸膜への遊離ヘモグロビンの吸着量は、50mg/カラムであった。同様に、中空糸膜内部の表面に数平均分子量が100のポリエチレングリコールビスアミンをスペーサーアームとし、ハプトグロビンを固定化したモジュールを調製した。当該中空糸膜へのハプトグロビンの固定化量は5マイクログラム/cm²であった。また、当該中空糸膜への遊離ヘモグロビンの吸着量は、10mg/カラムであった。従って、本発明の優位性が実証された。

【0020】《実施例2.》

——長鎖スペーサーアームを介したCD34抗体固定化中空糸膜の調製——

銅アンモニア法により再生したキュプロファン膜(ENKA社製)を共栓付試験管に入れ、数平均分子量が10,000のポリエチレングリコールビスアミンを炭酸水素ナトリウム緩衝液(0.2M炭酸水素ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、ポリエチレングリコールビスアミン濃度:10mg/ml)20mlと0.1mmolのCe²⁺水溶液(硝酸酸性)1mlとを添加した。次に、当該共栓付試験管にアルゴンガスを15分間吹き込んだ。次に、当該共栓付試験管を40°Cの恒温槽で1時間反応させ、ポリエチレングリコールビスアミンを結合した。次に、当該キュプロファン膜を注射用蒸留水1,000mlで洗浄した。次に、当該キュプロファン膜をモジュール化した後、当該キュプロファン膜のポリエチレングリコールビスアミン鎖を活性化した後、CD34抗体を固定化した。当該キュプロファン膜を更に、注射用蒸留水1,000mlで洗浄した。当該中空糸膜へのCD34抗体の固定化量は50マイクログラム/cm²であった。当該中空糸膜へのCD34(+)細胞の吸着量は、3×10⁶cells/カラムであった。同様に、当該キュプロファン膜内部の表面に数平均分子量が100のポリエチレングリコールビスアミンをスペーサーアームとし、CD34抗体を固定化したモジュールを調製した。当該中空糸膜へのCD34抗体の固定化量は5マイクログラム/cm²であった。また、当該中空糸膜へのCD34(+)細胞の吸着量は、10⁴cells/カラムであった。従って、本発明の優位性が実証された。

【0021】《実施例3.》

— スペーサーアームの長いプロテインAセファロースの調製 —

カルボキシセルロファイン（チッソ社製）50mlをカップリング緩衝液（0.2M炭酸水素ナトリウム、0.15M塩化ナトリウムpH9.0）100mlに懸濁した後、当該カップリング緩衝液に溶解した数平均分子量が2,000のポリエチレングリコールビスアミン（和光純薬製：1.0g/100ml）を添加し、4℃で24時間反応させた。24時間後に、当該懸濁液をブ

フナー漏斗上に移し、上記カップリング緩衝液1,000mlおよび注射用蒸留水1,000mlで洗浄し、pHを中性に戻した。次に、当該ポリエチレングリコールビスアミン結合カルボキシセルロファイン担体を注射用蒸留水100mlに懸濁し、容量80mlのカラムに充填、安定化した後、当該カラムにジメチルホルムアミド120mlと無水コハク酸40gとの混合溶液を循環させ、室温で12時間反応させた。12時間後に当該カラムにジメチルホルムアミド200mlを2時間循環させ、更に、当該カラムに注射用蒸留水1,000mlを2時間循環させることにより、当該カラムを洗浄した。次に、当該カラムに0.1mol/Lの4-モルホリノエタンスルホン酸溶液（pH8.4）100mlを10分間循環させた。続いて、当該カラムに水溶性1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩2gを溶解した、0.1mol/Lの4-モルホリノエタンスルホン酸溶液（pH8.4）100mlを1時間循環させ、カルボキシル基を活性化した。次に、当該カラムに氷冷した0.1mol/Lの4-モルホリノエタンスルホン酸溶液（pH4.8）200mlを1時間循環させ、過剰のカルボジイミドを除去した。次に当該カラムに、プロテインA含有（濃度10mg/ml）カップリング緩衝液（0.2M炭酸水素ナトリウム、0.15M塩化ナトリウムpH8.3）200mlを室温で24時間循環させ、当該担体にプロテインAを固定化した。次に当該カラムに、0.15mol/Lの塩化ナトリウム溶液1,000mlを循環させ、更に、注射用蒸留水1,000mlを循環させ、当該カラムを洗浄した。次に当該カラムに、0.2Mグリシン・トリス塩酸緩衝液（pH8.0）100mlを循環させ、未反応の活性基を不活化した。次に当該カラムに酢酸緩衝液（pH4.0）200mlを循環させ、更に、注射用蒸留水1,000mlを循環させ、当該カラムを

洗浄した。当該カラムへのプロテインAの固定化量は30mg/mlゲルであった。また、当該カラムへのIgGの吸着量は、10mg/mlゲルであった。同様にして、数平均分子量が100のポリエチレングリコールビスアミンをスペーサーアームとするプロテインAを固定化したカラムを調製した。当該カラムへのプロテインAの固定化量は5mg/mlゲルであった。また、当該カラムへのIgGの吸着量は、3mg/mlゲルであった。従って、本発明の優位性が実証された。

【0022】《実施例4.》

— スペーサーアームの長いレクチン固定化中空糸膜の調製 —

プロテインAの代わりにレクチン（Sigma社製 Wheat Germ Lectin）を用いた他は、実施例1と同様にして、レクチン固定化中空糸膜を調製した。レクチンの結合量は、 $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。当該中空糸膜にヒト白血球懸濁液100mlを循環させ、当該中空糸膜にヒト白血球（T-lymphocyte）細胞を結合させた。次に、当該中空糸膜に注射用蒸留水1,000mlを30分間循環させ、当該中空糸膜を洗浄した。次に、当該中空糸膜内部を0.1%ペプシン溶液（Sigma社製）で満たし、37℃で3分間incubateした。3分後に細胞培養用MEM培地（Gibco社製）200mlを5分間循環させ、ヒト白血球（T-lymphocyte）細胞を回収した。回収したヒト白血球（T-lymphocyte）細胞数は、 2×10^5 cellsであった。同様にして、数平均分子量が100のポリエチレングリコールビスアミンをスペーサーアームとする、レクチン結合中空糸膜を作製した。当該中空糸膜へのレクチンの結合量は、 $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。また、当該中空糸膜の回収ヒト白血球（T-lymphocyte）細胞数は、 2×10^4 cellsであった。従って、本発明の優位性が実証された。

【0023】

【発明の効果】本発明にかかわる生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着体により、短時間、省エネルギー、省スペース、高吸着性能で生理活性物質、ヒト血球分化細胞およびヒト細胞の吸着が可能である。将来は、現在アフィニティー吸着分離が実施されている分野では、すべて本発明に係わる技術に置換されるものと考えられる。